

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2005年6月30日 (30.06.2005)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2005/058951 A1

(51)国際特許分類⁷: C07K 14/52, C12N 15/19, C12P 21/02, A61K 31/711, 48/00, A61P 1/04, 1/16, 7/00, 9/00, 11/00, 13/12, 17/02, 19/08, 25/28, 35/00, 43/00

(74)代理人: 岩谷 龍 (IWATANI, Ryo); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番27号 桜橋千代田ビル5階 Osaka (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP2004/018719

(81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22)国際出願日: 2004年12月15日 (15.12.2004)

(84)指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25)国際出願の言語: 日本語

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 補正書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(26)国際公開の言語: 日本語

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドノート」を参照。

(30)優先権データ:
特願 2003-418790

JP

2003年12月16日 (16.12.2003)

特願 2003-425691

2003年12月22日 (22.12.2003)

JP

(71)出願人および

(72)発明者: 中村 敏一 (NAKAMURA, Toshikazu) [JP/JP]; 〒6068333 京都府京都市左京区岡崎法勝寺町1-4 Kyoto (JP).

(72)発明者: および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 松本 邦夫 (MATSUMOTO, Kunio) [JP/JP]; 〒5620031 大阪府箕面市小野原東6丁目25-2-204 Osaka (JP). 福田 一弘 (FUKUTA, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒5620031 大阪府箕面市小野原東5丁目18-27 メゾンロベリア202号 Osaka (JP).



A1

(54) Title: SUGAR CHAIN-LACKING HEPATOCYTE GROWTH FACTOR

(54)発明の名称: 糖鎖欠損型肝細胞増殖因子

(57)Abstract: It is intended to provide a modification lacking a sugar chain of HGF and a process for producing the same. A sugar chain-lacking hepatocyte growth factor wherein a mutation has been transferred into at least one sugar chain-attachment site in the amino acid sequence of hepatocyte growth factor so as to prevent the attachment of a sugar chain.

(57)要約: HGFの糖鎖を欠損させた変形体及びその製造方法を提供すること。肝細胞増殖因子の少なくとも1ヶ所の糖鎖付加部位において糖鎖が付加されないようにアミノ酸配列に変異を導入された糖鎖欠損型肝細胞増殖因子。

WO 2005/058951

明 細 書

糖鎖欠損型肝細胞増殖因子

技術分野

[0001] 本発明は、糖鎖欠損型肝細胞増殖因子に関する。より詳細には、肝細胞増殖因子の糖鎖を欠損させることによって改変した肝細胞増殖因子に関する。

背景技術

[0002] 肝細胞増殖因子(以下、HGFともいう。)は肝実質細胞の増殖活性を有する蛋白質であり、異なったアミノ酸配列を有するものが報告されており、その名称はHGF以外にSF(scatter factor)、TCF(Tumor cytotoxic factor)等が使用されている。本発明では、これらの公知の肝実質細胞増殖活性を有する蛋白質をHGFと総称する。HGFは肝実質細胞の増殖以外にも細胞遊走促進、形態形成促進、血管新生作用、神経保護作用又は抗アポトーシス作用等様々な薬理作用を示す生理活性ペプチドであることが知られている(非特許文献1参照。)。HGFはその薬理作用から肝硬変治療剤、腎疾患治療剤、上皮細胞増殖促進剤、抗ガン剤、ガン療法用副作用防止剤、肺障害治療剤、胃・十二指腸損傷治療剤、脳神経障害治療剤、免疫抑制副作用防止剤、コラーゲン分解促進剤、軟骨障害治療剤、動脈疾患治療剤、肺線維症治療剤、肝臓疾患治療剤、血液凝固異常治療剤、血漿低蛋白治療剤、創傷治療剤、神経障害改善薬、造血幹細胞増加剤又は育毛促進剤等としての開発が期待されている(例えは特許文献1～14参照。)。

[0003] HGFは、肝臓、脳、肺臓、骨髓、ひ臓、胎盤又は腎臓等の臓器あるいは血小板や白血球等の血液細胞等から分泌されるが、生体内には極微量にしか存在しないため、HGFを医薬製剤として用いるためには、遺伝子工学的手法により細胞を用いて大量に生産する必要がある。従来、HGFはチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞等の動物細胞を用いて生産できることが知られている(特許文献15、16参照。)。しかし、一般にCHO細胞等の動物細胞を用いて蛋白質を生産する方法はコストが高く、引いては薬価の上昇につながることが考えられる。

[0004] 安価に蛋白質を組換え生産する方法としては、大腸菌等の原核生物に目的遺伝

子を導入して発現させる方法が知られている(非特許文献2参照。)。しかし、大腸菌等の原核生物で生産した組換え蛋白質には糖鎖が付加されないという問題がある。これは、大腸菌等の原核生物には糖鎖合成の場である小胞体及びゴルジ体が存在しないからである。

- [0005] 動物細胞内での蛋白質への糖鎖付加及び糖鎖の修飾は、DNAあるいは蛋白質の生合成の場合とは異なり、鑄型によらない翻訳後修飾(post-translational modification)である。この翻訳後修飾は小胞体及びゴルジ体と呼ばれる細胞内小器官に局在する数多くの糖鎖合成関連酵素が介在する複雑な機構を通して行われる。すなわち、特定の単糖と、その結合様式に特異的な酵素(糖加水分解酵素及び糖転移酵素)との連携による複雑な生合成経路に従って、単糖が順次切り取られたり付加されたりしながら、所定の糖鎖構造が得られるように糖鎖が伸長されていく(非特許文献3参照。)。このようにして蛋白質に付加される糖鎖は高等生物の生命現象全般に深く関わっていることが知られている(非特許文献4、5参照。)。
- [0006] ヒト体内の蛋白質の半数以上は糖鎖が付加された糖蛋白質として存在することが知られている(非特許文献6参照。)。
- 本来糖鎖の付加された形で存在し、活性を有する糖蛋白質を糖鎖のない状態にすると、活性を失うことが懸念される。例えば、赤血球造血ホルモンとして知られるエリスロポチンでは糖鎖を除去すると薬効を失ってしまうことが知られている(非特許文献7参照。)。
- [0007] 蛋白質を安価に生産できる宿主で糖鎖付加の能力を有する細胞としては酵母が知られている(非特許文献8ー10参照。)。酵母は真核生物であり、小胞体及びゴルジ体を有しているため、糖鎖合成機構が備わっている。しかし、酵母の糖鎖合成機構は動物細胞とは大きく異なっているため、糖鎖付加部位を有する蛋白質を酵母で生産すると、酵母型の糖鎖が付加されることになる。酵母の糖鎖構造はヒトその他の中乳動物の糖鎖構造とは大きく異なっていることが知られている(非特許文献11参照。)。

このため、このような組換え蛋白質はヒトその他の中乳動物に対して抗原性を示すのでヒト及び動物の医薬品として用いることはできない。

[0008] また、昆虫細胞も糖鎖付加能を有する宿主であって、比較的安価に蛋白質を生産することができるが、昆虫細胞の糖鎖構造もヒト型の糖鎖構造とは異なることが知られている(非特許文献12参照。)。

従って、昆虫細胞もヒトその他の哺乳動物に対して抗原性を示す可能性がある。

[0009] そこで、酵母や昆虫細胞等を用いて生産した蛋白質から糖鎖を除去するか、もしくは蛋白質分子中の糖鎖付加部位に変異が導入されたようにした遺伝子を酵母や昆虫細胞等に導入することで、糖鎖付加のない蛋白質をつくることが考えられる。しかし、上述のように、本来糖鎖の付加された形で存在する蛋白質を糖鎖のない状態にすると、活性を失うことが懸念される。

[0010] HGFは5本の糖鎖が付加されている(非特許文献13、14参照。)。HGFの糖鎖を除去した場合の活性への影響については、N-結合型糖鎖付加の阻害剤であるツニカマイシンをHGF産生細胞に添加して培養した場合、產生されるHGFが細胞遊走活性を保持しているとの報告がある(論文中ではHGFはSFと表されている)(非特許文献15参照。)。

しかし、この論文では、ツニカマイシン存在下で產生されたHGFの糖鎖がどの程度欠損しているかについての解析がなされておらず、十分な知見を与えるものではない。

また、同論文において、HGFをN-グリカナーゼやO-グリカナーゼで処理しても、HGFが細胞遊走活性を保持しているとの記載があるが、同論文中ではN-グリカナーゼ処理したHGFやO-グリカナーゼ処理したHGFが、糖鎖を認識するConAカラムに吸着されていることを示している。N-グリカナーゼ処理したHGFやO-グリカナーゼ処理したHGFがConAカラムに吸着されることは、糖鎖の除去が十分になされていないことを意味する。したがって、N-グリカナーゼ処理したHGFやO-グリカナーゼ処理したHGFが細胞遊走活性を保持しているとの記載は、糖鎖を欠損したHGFが細胞遊走活性を保持していると結論づけるものではない。

[0011] さらに、HGFは細胞遊走活性に加えて細胞増殖、形態形成促進、血管新生作用、抗細胞死活性又は神経保護作用等多岐にわたる活性を有している(非特許文献16参照。)。

糖鎖を欠損したHGFが細胞遊走活性を有していても、他の機能も有しているとは言い難い。例えば、HGFのトランケート型バリアントであるNK2は、細胞遊走活性を有するが、細胞増殖活性は有していない(非特許文献17参照。)。

このように、HGFの糖鎖が欠損した場合に、HGFが多彩な機能を保持しているかどうかは全く不明であった。HGFは多彩な活性を有することから、生体修復因子と考えられており、HGFの糖鎖を欠損させても、HGFの高度な機能に影響がないとは考えられなかった。

特許文献1:特開平4-18028号公報

特許文献2:特開平4-49246号公報

特許文献3:欧州特許出願公開第492614号明細書

特許文献4:特開平6-25010号公報

特許文献5:国際公開第93/8821号パンフレット

特許文献6:特開平6-172207号公報

特許文献7:特開平7-89869号公報

特許文献8:特開平6-40934号公報

特許文献9:国際公開第94/2165号パンフレット

特許文献10:特開平6-40935号公報

特許文献11:特開平6-56692号公報

特許文献12:特開平7-41429号公報

特許文献13:国際公開第93/3061号パンフレット

特許文献14:特開平5-213721号公報

特許文献15:特開平11-4696号公報

特許文献16:特開平10-191991号公報

非特許文献1:マツモト・ケー(Matsumoto, K)ら、キドニー・インターナショナル(Kidney International)、2001年、第59巻、p. 2023-2038

非特許文献2:スワーツ・ジェイ・アール(Swartz, J. R.)、カレント・オピニオン・イン・バイオテクノロジー(Current opinion in biotechnology)、2001年、第12巻、p. 195-201

非特許文献3:コーンフェルド・アール(Kornfeld, R.)他1名、アニユアル・レビュー・オブ・バイオケミストリー(Annual review of biochemistry.)、1985年、第54巻、p. 631–664

非特許文献4:コバタ・エー(Kobata, A.)、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(European journal of biochemistry)、1992年、第209巻、p. 483–501

非特許文献5:バーキ・エー(Varki, A.)、グリコバイオロジー(Glycobiology)、1993年、第3巻、p. 97–130

非特許文献6:グーチー・シー・エフ(Goochee, C. F.)ら、バイオテクノロジー(Bio technology)、1991年、第9巻、p. 1347–1355

非特許文献7:タケウチ・エム(Takeuchi, M.)他1名、グリコバイオロジー(Glycobi ology)、1991年、第1巻、p. 337–346

非特許文献8:ウイスマン・エー(Wiseman A.)、エンデボーア(Endeavour.)、1996年、第20巻、p. 130–132

非特許文献9:ラッセル・シー(Russell, C.)ら、オーストラリアン・ジャーナル・オブ・バイオテクノロジー(Australian journal of biotechnology)、1991年、第5巻、p. 48–55

非特許文献10:ブックホルツ・アール・ジー(Buckholz, R. G.)他1名、バイオテクノロジー(Biotechnology)、1991年、第9巻、p. 1067–1072

非特許文献11:ゲミル・ティー・アール(Gemmill, T. R.)他1名、バイオケミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ(Biochimica et biophysica acta)、1999年、第1426巻、p. 227–237

非特許文献12:アルトマン・エフ(Altmann, F.)ら、グリココンジュゲイト・ジャーナル(Glycoconjugate journal)、1999年、第16巻、p. 109–123

非特許文献13:ハラ・エイチ(Hara, H.)ら、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(Jo urnal of biochemistry)、1993年、第114巻、p. 76–82

非特許文献14:シミズ・エヌ(Shimizu, N.)ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジ カル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochemical and biophysical research

communications)、1992年、第189巻、p. 1329–1335

非特許文献15:ホフマン・アール(Hofmann, R.)ら、バイオケミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ(Biochimica et biophysica acta)、1992年、第1120巻、p. 343–350

非特許文献16:マツモト・ケー(Matsumoto, K.)他1名、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochemical and biophysical research communications)、1997年、第239巻、p. 639–644

非特許文献17:ハートマン・ジー(Hartmann, G.)ら、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)、1992年、第89巻、p. 11574–11578

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明の課題は、HGFの糖鎖を欠損させた糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を提供し、またその製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは上記課題を解決すべくHGFの糖鎖機能に関する研究を鋭意重ねた結果、HGFの糖鎖を除去してもHGFの機能が保持されることを見出した。HGFのような高度な機能を有する蛋白質が、糖鎖を除去しても機能を保持していることは全く予想外のことであった。それどころか、糖鎖欠損型HGFは糖鎖を有するHGFに比べて血中安定性が向上しており、このような事実は全く驚くべき発見であった。以上の発見に基づき、本発明者らはさらに研究をすすめ本発明の完成に至った。

すなわち、本発明は、

- (1) 肝細胞増殖因子の糖鎖付加部位の全部又は少なくとも一ヶ所において糖鎖が欠損していることを特徴とする糖鎖欠損型肝細胞増殖因子、
- (2) 上記(1)記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子であって、肝細胞増殖因子の少なくとも1ヶ所の糖鎖付加部位において糖鎖が付加されないようにアミノ酸配列に変異が導入された糖鎖欠損型肝細胞増殖因子、

(3) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列に対して、次のa)からd)に示される改変の少なくとも一つ以上がなされていることを特徴とする上記(2)記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子；

a) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列中に存在するAsn-X-Ser又はAsn-X-Thr(XはPro以外のアミノ酸を示す。)で示されるN-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列のうち、少なくとも一つのコンセンサス配列のAsnが他のアミノ酸残基に置換されている；

b) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列中に存在するAsn-X-Ser又はAsn-X-Thr(XはPro以外のアミノ酸を示す。)で示されるN-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列のうち、一つのコンセンサス配列のSer又はThr、あるいは2以上のコンセンサス配列のSer又は／及びThrが他のアミノ酸残基に置換されている；

c) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列中に存在するAsn-X-Ser又はAsn-X-Thr(XはPro以外のアミノ酸を示す。)で示されるN-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列のうち、少なくとも一つのコンセンサス配列のXがProに置換されている；又は

d) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列中に存在する少なくとも一つのO-結合型糖鎖付加を受けるSer又は／及びThrが他のアミノ酸残基に置換されている、

(4) 肝細胞増殖因子がヒト肝細胞増殖因子であることを特徴とする上記(1)から(3)のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子、

(5) 肝細胞増殖因子がネコ又はイヌ肝細胞増殖因子であることを特徴とする上記(1)から(3)のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子、

(6) 配列番号1に記載のアミノ酸配列をもとに改変される上記(1)から(4)のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子であって、配列番号1中のアミノ酸に対して、次のa)からe)に示される改変の少なくとも一つ以上がなされていることを特徴とする糖鎖欠損型肝細胞増殖因子；

a) 第294位又は／及び第296位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第295位のアミノ酸がProに置換されることによって第294位に糖鎖が付加されていない；

b) 第402位又は／及び第404位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第403位のアミノ酸がProに置換されることによって第402位に糖鎖が付加されていない；

- c) 第476位のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることによって第476位に糖鎖が付加されていない;
 - d) 第566位又は／及び第568位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第567位のアミノ酸がProに置換されていることによって第566位に糖鎖が付加されていない;
又は
 - e) 第653位又は／及び第655位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第654位のアミノ酸がProに置換されていることによって第653位に糖鎖が付加されていない、
及び
- (7) 配列番号2に記載のアミノ酸配列をもとに改変される上記(1)から(4)のいずれかに記載の肝細胞増殖因子であって、配列番号2中のアミノ酸に対して、次のa)からe)に示される改変の少なくとも一つ以上がなされていることを特徴とする糖鎖欠損型肝細胞増殖因子；
- a) 第289位又は／及び第291位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第290位のアミノ酸がProに置換されていることによって第289位に糖鎖が付加されていない;
 - b) 第397位又は／及び第399位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第398位のアミノ酸がProに置換されていることによって第397位に糖鎖が付加されていない;
 - c) 第471位のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることによって第471位に糖鎖が付加されていない;
 - d) 第561位又は／及び第563位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第562位のアミノ酸がProに置換されていることによって第561位に糖鎖が付加されていない;
又は
 - e) 第648位又は／及び第650位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第649位のアミノ酸がProに置換されていることによって第648位に糖鎖が付加されていない、
に関する。

[0014] また、本発明は、

- (8) 上記(1)から(7)のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子をコードし
る塩基配列からなるDNA、
- (9) 上記(8)記載のDNAを組み込んだベクター、

- (10) 上記(9)記載のベクターを細胞に導入し、該細胞を培養し、該細胞内もしくは該細胞の培養液中に糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を產生せしめ、該細胞内もしくは該細胞の培養液中から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする上記(1)から(7)のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法、
- (11) 細胞が真核細胞である上記(10)記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法、
- (12) 真核細胞が酵母又は昆虫細胞である上記(11)記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法、
- (13) 上記(9)記載のベクターを昆虫個体に導入し、昆虫個体中に糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を產生せしめ、該昆虫個体から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする上記(1)から(7)のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法、
- (14) 糖鎖を有する肝細胞増殖因子を酵素で処理することによって糖鎖を全部又は部分的に除去し、該酵素反応液から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする上記(1)から(7)のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法、
- (15) 糖鎖を有する肝細胞増殖因子をコードする塩基配列を含むDNAを組み込んだベクター又は上記(9)記載のベクターからなる遺伝子を糖鎖付加能のない細胞に導入し、該細胞を培養し、該細胞内もしくは該細胞の培養液中に糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を產生せしめ、該細胞内もしくは該細胞の培養液中から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする上記(1)から(7)のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法、
- (16) 糖鎖を有する肝細胞増殖因子をコードする塩基配列又は上記(8)記載の塩基配列からなる遺伝子を鋳型として無細胞蛋白質合成システムによって糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を合成し、該合成反応液から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする上記(1)から(7)のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法、
- (17) 上記(1)から(7)のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を有効成

分とする医薬製剤、及び

(18) 上記(8)記載のDNAを含む遺伝子治療薬、
に関する。

発明の効果

[0015] 本発明の糖鎖欠損型HGFは、細胞増殖活性、細胞遊走活性又は形態形成活性等において糖鎖を有するHGFと同等の活性を有し、温度安定性も同等であるので、糖鎖を有するHGFの代替品となり得る。従って、本発明の糖鎖欠損型HGFを有効成分とする医薬製剤は、糖鎖を有するHGFと同様の用途、すなわち、哺乳動物(例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ラット、マウス、ウサギ、ウマ、ウシ、ヒツジ、モルモット等)に対し、肝硬変治療剤、腎疾患治療剤、上皮細胞増殖促進剤、抗ガン剤、ガン療法用副作用防止剤、肺障害治療剤、胃・十二指腸損傷治療剤、脳神経障害治療剤、免疫抑制副作用防止剤、コラーゲン分解促進剤、軟骨障害治療剤、動脈疾患治療剤、肺線維症治療剤、肝臓疾患治療剤、血液凝固異常治療剤、血漿低蛋白治療剤、創傷治療剤、神経障害改善薬、造血幹細胞増加剤又は育毛促進剤等として用いることができる。

また、本発明の糖鎖欠損型HGFをコードするDNAを含む医薬は、上記疾患の遺伝子治療薬として用いることができる。

また、本発明の糖鎖欠損型HGFは糖鎖を有するHGFよりも血中安定性が向上しているので、HGFの投与量を低減することができ、HGFによる副作用の防止が図れる。

本発明の糖鎖欠損型HGFは、酵母や昆虫細胞での生産が可能であるため、安価に生産することができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]各HGFのSDS-PAGEによる分析結果を示す図である。各HGFを還元処理して泳動した後、ゲルを銀染色した。

[図2]HGFの肝実質細胞増殖活性について、ラット肝実質細胞のDNA合成量を指標として示した図である。

[図3]HGFの細胞遊走活性について、MDCK細胞の分散の程度によって比較した

結果を示す図である。

[図4]HGFの形態形成活性について、MDCK細胞の管腔形成の程度によって比較した結果を示す図である。

[図5]HGFの温度安定性を示す図である。37°Cにおいて各HGFを表示された日数の間インキュベートした。残存活性をラット肝実質細胞のDNA合成量を指標として測定し、相対値として表した。

[図6]HGFの血中安定性を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0017] 以下、本発明を詳細に説明する。本発明に係わる糖鎖欠損型HGFは、糖鎖を有する哺乳動物、例えばヒト、イヌ、ネコ、ラット、マウス、ウサギ、ウマ、ウシ、ヒツジ又はモルモット等のHGFの糖鎖付加部位の全部又は少なくとも1ヶ所の糖鎖が欠損するように、構造が改変されたHGFをいう。

また、本発明の糖鎖欠損型HGFには、公知のHGFに糖鎖が付加されないように変異が導入されたアミノ酸配列のうち、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつHGF活性を有する蛋白質も含まれる。さらに、本発明の糖鎖欠損型HGFには、公知のHGFに糖鎖が付加されないように変異が導入されたアミノ酸配列と少なくとも約60%以上の相同性を有する蛋白質、好ましくは約80%以上の相同性を有する蛋白質、より好ましくは約90%以上の相同性を有する蛋白質、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する蛋白質であって、かつHGF活性を有する蛋白質も含まれる。

なお、アミノ酸配列について、「1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入」とは、部位特異的突然変異誘発法等の周知の技術的方法により、又は天然に生じうる程度の数が、欠失、置換、付加又は挿入等されていることを意味する。

また、上記アミノ酸配列について「相同」とは、蛋白質の一次構造を比較し、配列間において各々の配列を構成するアミノ酸残基の一致の程度の意味である。

本発明の糖鎖欠損型HGFは、HGFの糖鎖付加部位の少なくとも一ヶ所において糖鎖が付加されないように変異を導入したHGF遺伝子を組み込んだベクターを細胞に導入して得られる。

また、本発明の糖鎖欠損型HGFは、糖鎖を有するHGFの塩基配列を含むベクターを糖鎖付加能のない細胞に導入して得ることもできる。

[0018] HGFの糖鎖付加部位の少なくとも一ヶ所において糖鎖が付加されないようにHGF遺伝子に変異を導入する方法としては、欠損させたい糖鎖の付加部位のアミノ酸配列に対応する塩基配列に変異を導入するのがよい。蛋白質に糖鎖が付加する場合、糖鎖にはN結合型糖鎖とO—結合型糖鎖があるので、それぞれについて次のような変異を導入する。

N—結合型糖鎖にはコンセンサス配列[Asn—X—Ser又はAsn—X—Thr(Xはプロリン以外のアミノ酸を示す。)]が存在することが知られている。コンセンサス配列が存在するときにはAsnに糖鎖が結合する(Kobata, A., Eur. J. Biochem. , 1992年、第209巻、p. 483—501)。このため、コンセンサス配列中のAsnを他のアミノ酸(例えば、Gln等)に変換するか、あるいは、Ser又はThrを他のアミノ酸(例えば、Gly、Ala等)に変換するように塩基配列に変異を導入することで、該当部位のN—結合型糖鎖を欠損させることができる。この場合、変換に用いるアミノ酸は、上記コンセンサス配列の前後のアミノ酸配列と新たなコンセンサス配列を形成しないアミノ酸を適宜選択するのが好ましい。また、コンセンサス配列中のXの部位にプロリンが導入されるように塩基配列に変異を導入してもよい。

O—結合型糖鎖にはコンセンサス配列は存在しないが、O—結合型糖鎖では、SerがThrの水酸基に糖鎖が付加するので、O—結合型糖鎖付加を受ける部位のSer又はThrを他のアミノ酸(例えば、Gly等)に変換するように塩基配列に変異を導入することで該当部位の糖鎖を欠損させることができる。この場合、変換に用いるアミノ酸は、該アミノ酸の前後のアミノ酸配列と上記コンセンサス配列を形成しないアミノ酸を適宜選択するのが好ましい。

[0019] HGFにおける糖鎖付加部位は、例えばヒトHGFにおいては、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の第294位のAsn(N—結合型糖鎖)、第402位のAsn(N—結合型糖鎖)、第476のThr(O—結合型糖鎖)、第566位のAsn(N—結合型糖鎖)、第653位のAsn(N—結合型糖鎖)である。また、配列表の配列番号2で示される5アミノ酸欠失型ヒトHGFにおける糖鎖付加部位は、第289位のAsn(N—結合型糖鎖)

、第397位のAsn(N-結合型糖鎖)、第471のThr(O-結合型糖鎖)、第561位のAsn(N-結合型糖鎖)、第648位のAsn(N-結合型糖鎖)である。

また、上記ヒトHGFの上記コンセンサス配列は、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の第294位から第296位、第402位から第404位、第566位から第568位、及び第653位から第655位に存在する。5アミノ酸欠失型ヒトHGFでは、コンセンサス配列は、配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列の第289位から第291位、第397位から第399位、第561位から第563位、及び第648位から第650位に存在する。

[0020] HGFの塩基配列に変異を導入する方法としては、変異を導入したい部分に対応する変異プライマーを合成し、クンケル法等の既知の技術を用いて行うことができる。また、市販の変異導入キット等を用いるとより簡便に変異を導入することができる。

こうして得られた糖鎖欠損型HGFのアミノ酸配列をコードするDNAあるいは糖鎖を有するHGFのアミノ酸配列をコードするDNAを含有するプラスミドやファージ等の組換ベクターから、制限酵素によって該DNAを切り出し、糖鎖欠損型HGFの発現に適したベクターのプロモーターの下流に制限酵素とDNAリガーゼを用いて再結合して組換発現ベクターを作製することが出来る。より詳しくは、転写の下流方向に順番に、必要により(1)プロモーター、(2)リボソーム結合部位、(3)開始コドン、(4)本発明の糖鎖欠損型HGFをコードする塩基配列を含むDNA、(5)終止コドン、(6)タミネーター等を含むように組換発現ベクターが構築される。

上記DNAには、上記糖鎖付加部位に変異が導入された糖鎖欠損型HGFをコードする塩基配列からなるDNAだけでなく、(a)前記糖鎖欠損型HGFをコードする塩基配列の塩基の1もしくは数個の塩基が欠失、置換、付加もしくは挿入された塩基配列を有し、かつHGF活性を有する蛋白質をコードするDNA、(b)前記糖鎖欠損型HGFをコードする塩基配列を有するDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつHGF活性を有する蛋白質をコードする塩基配列からなるDNA、又は(c)前記糖鎖欠損型HGFをコードする塩基配列を有するDNAと少なくとも約60%以上の相同性を有し、かつHGF活性を有する蛋白質をコードする塩基配列からなるDNAも包含するものである。

上記塩基配列について、「1もしくは数個の塩基が欠失、置換、付加もしくは挿入」というときは、部位特異的突然変異誘発法等の周知の技術的方法により、又は天然に生じうる程度の数の塩基が、欠失、置換、付加又は挿入等されていることを意味する。

ストリンジエントな条件下でハイブリダイズ可能なDNAとは、上記DNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ラーク・ハイブリダイゼーション法、あるいはサザンプロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味する。

ストリンジエントな条件とは、塩濃度、例えば約0.1～2倍程度の濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる。)、温度約65°C程度でのハイブリダイズ条件をいう。

相同性を有するDNAとは、ハイストリンジエントな条件において、少なくとも約60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは約80%以上の相同性を有するDNA、より好ましくは、約90%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するDNAをいう。なお、ハイストリンジエントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40mM程度、好ましくは約19～20mM程度で、温度が約50～70°C程度、好ましくは約60～65°C程度の条件をいう。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65°C程度の場合が最も好ましい条件である。

[0021] 本発明で用いることが出来るベクターとしては、大腸菌を宿主とする場合はpBR322、pUC18、pUC19(東洋紡績)等のプラスミドを、枯草菌を宿主とする場合はpUB110(シグマ社)等のプラスミドを、酵母を宿主とする場合はpYES2(Invitrogen)、pRB15(ATCC37062)等のプラスミドを用いることができる。動物細胞用の発現ベクターとしては、pCAGGS又はpCXN2(Niwa, H. , Yamamura, K. and Miyazaki, J. , Gene, 1991年, 第108巻, p. 193–200、特開平03–168087)、pcDL-SR α (Takebe, Y. et al. , Mol. Cell. Biol. , 1988年、第8巻, p. 466–472)等が挙げられる。その他、バクテリオファージ λ gt10、 λ gt11(ストラタジーン社)、ウイルスSV40(BRL社)、BPV(ATCC VR-703)又はレトロウイルスの遺伝子由來のベクター等を列挙できるが、宿主内で複製・増幅可能なベクターであれば特に限

定はない。

[0022] プロモーター又はターミネーターに関しても、糖鎖欠損型HGFをコードする塩基配列の発現に用いられる宿主に対応したものであれば特に限定はない。プロモーターの例としては、宿主が大腸菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λ PLプロモーター又はlppプロモーター等が挙げられ、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター又はADHプロモーター等が挙げられる。動物細胞を宿主として用いる場合は、ラウス肉腫ウイルス(ウイルスRSV)、MPSV、ポリオマーウイルス、鶏頭ウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス(SMV)、B型肝炎ウイルス、シミアンウイルス40(SV40)又はワクシニアウイルス等のウイルスゲノムから得られるプロモーター、メロチオネインプロモーター又はヒートショックプロモーター等が挙げられる。また、高等哺乳動物宿主を用いる際には、好ましくは、ベクターにエンハンサーを導入する。エンハンサーを導入することにより転写が増大する。エンハンサーとしては、SV40エンハンサー、サイトメガロウイルスの初期プロモーター／エンハンサー、ポリオマーエンハンサー又はアデノウイルスのエンハンサー等が挙げられる。またターミネーターとしては、宿主が大腸菌の場合、trpターミネーター又は1ppターミネーター等を、宿主が枯草菌の場合、amyFターミネーター等を、宿主が酵母の場合、CYC1ターミネーター等を、宿主が動物細胞の場合、SV40ターミネーター又はHSV1TKターミネーター等を例示することが出来る。これらのプロモーターとターミネーターは用いる宿主に応じて適宜組み合わせて用いるのが好ましい。

[0023] このようにして構築された糖鎖欠損型HGF発現ベクターは、コンピテント細胞法(J. Mol. Biol.、1970年、第53巻、p. 154)、プロトプラスト法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1978年、第75巻、p. 1929)、リン酸カルシウム法(Science、1983年、第221巻、p. 551)、DEAEデキストラン法(Science、1982年、第215巻、p. 166)、電気パルス法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1984年、第81巻、p. 7161)、インビトロパッケージング法(Proc. Nat. Acad. Sci. USA、1975年、第72巻、p. 581)、ウイルスベクター法(Cell、1984年、第37巻、p. 1053)、又はマイクロインジェクション法(Exp. Cell. Res.、1984年、第153巻、p. 347)等によって宿主に導入さ

れ、形質転換体が作製される。

[0024] 宿主として用いることのできる細胞としては、特に制限はなく、動物、植物、昆虫、原核微生物又は真核微生物の細胞等が挙げられる。これらの細胞は個体を形成してもよく、動物個体、植物個体又は昆虫個体を宿主としてもよい。動物細胞では、付着性細胞又は浮遊性細胞の何れも使用でき、糖鎖欠損型HGFを細胞内に生産蓄積する動物細胞でもよく、あるいは糖鎖欠損型HGFを細胞外に分泌生産する動物細胞でもよい。例えば、CHO細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞)、COS細胞、BHK細胞、マウスC127細胞又はHeLa細胞等が挙げられる。植物細胞ではイネ、タバコ又はシロイヌナズナ等を挙げることができ、昆虫細胞ではSf9やSf21等の細胞を挙げることができる。昆虫個体では例えばカイコを挙げができる。原核微生物では大腸菌又は枯草菌等が挙げられ、真核微生物ではSaccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Candida boidinii又はPichia pastoris等の酵母あるいはAspergillus属、Trichoderma属又はMucor属等の糸状菌を挙げができる。好ましくは、酵母、昆虫細胞又は昆虫個体である。これらのうち、原核生物の細胞では、糖鎖付加能がないため、野生型の糖鎖を有するHGF遺伝子を導入してもよい。

[0025] 得られた形質転換体は、目的とする糖鎖欠損型HGFを產生させるためにその宿主に応じた適切な培地中で培養される。培地中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物、ビタミン、血清及び薬剤等が含有される。培地の例としては、形質転換体の宿主が大腸菌の場合、LB培地(日本製薬)又はM9培地[J. Exp. Mol. Genet., Cold Spring Laboratory, New York, 1972年, p. 431]等が挙げられ、宿主が酵母の場合はYPD培地(Genetic Engineering、第1巻、Plenum Press, New York, 1979年, p. 117)等が挙げられる。宿主が動物細胞の場合、約20%以下のウシ胎児血清を含有する変形イーグル培地(MEM培地)、ダルベッコ変形イーグル培地(DMEM培地)又はRPMI1640培地(日本製薬)等を挙げることが出来る。形質転換体の培養は、通常約20°C~45°C、pHは約5~8の範囲で行われ、必要に応じて通気、攪拌が行われる。また、宿主が接着性の動物細胞等の場合は、ガラスピーズ、コラーゲンピーズ、あるいはアセチルセルロースホローファイ

バー等の担体が用いられる。これら以外の培地組成あるいは培養条件下でも形質転換体が生育すれば、これらに限定されるものではない。

- [0026] このようにして形質転換体の培養上清中又は形質転換体中に生成した糖鎖欠損型HGFは、公知の塩析法、溶媒沈殿法、透析法、限外濾過法、ゲル電気泳動法、ゲル濾過クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、逆相クロマトグラフィ及びアフィニティクロマトグラフィ等の1種又は2種以上を組み合わせて分離精製することが出来る。特に、精製方法として、硫酸アンモニウムによる塩析法、S-セファロースイオンクロマトグラフィ、ヘパリンセファロースアフィニティクロマトグラフィ、及びフェニルセファロース逆相クロマトグラフィの組み合せ、あるいは硫酸アンモニウムによる塩析法、S-セファロースイオンクロマトグラフィ、及び抗HGF抗体セファロースアフィニティクロマトグラフィの組み合わせ等が好ましい。
- [0027] また、本発明の糖鎖欠損型HGFは、従来の既知の方法により糖鎖が付加したHGFを得た後、糖鎖を除去する酵素で該HGFを処理することでも得られる。糖鎖を除去する酵素としては、N-結合型糖鎖の除去の目的ではグリコペプチダーゼF又はグリコペプチダーゼA等を使用することができる。O-結合型糖鎖の除去は、シアリダーゼ、フコシダーゼ及びO-グリカナーゼ等の1種又は2種の組み合わせによって達成される。酵素処理して得られた糖鎖除去HGFは、本発明の糖鎖欠損型HGFとして上述の精製法によって精製することができる。
- [0028] さらに、本発明の糖鎖欠損型HGFは、無細胞蛋白質合成システムを利用して得ることもできる。無細胞蛋白質合成システムとは、大腸菌、ウサギ網状赤血球細胞又は小麦胚芽等から調製した細胞抽出液を用いるか、あるいは細胞抽出液中に含まれる蛋白質合成因子群を利用して、目的蛋白質をコードするDNAあるいはmRNAを錆型として、生細胞を用いずに蛋白質合成を行うシステムをいう。細胞抽出液にはリボソーム、tRNA又は翻訳因子等の蛋白質合成に必要な分子群が含まれているため、これにATPやGTP等のエネルギー源及び基質となるアミノ酸を添加すると、蛋白質が合成される。細胞抽出液の代わりに、細胞抽出液中に含まれる蛋白質合成因子群を混合して用いてもよい。無細胞蛋白質合成システムでは、小胞体やゴルジ体が含まれないため、糖鎖付加部位を有する糖鎖を有するHGFをコードするDNAあるい

はmRNAを鋳型として、糖鎖の欠損した糖鎖欠損型HGFを生産することができる。また、糖鎖付加部位に変異を導入したDNAあるいはmRNAを用いることもできる。無細胞蛋白質合成反応液中において合成された糖鎖欠損型HGFは、上述の精製法によって精製することができる。

- [0029] 上記のようにして得られる本発明の糖鎖欠損型HGFは、細胞増殖活性、細胞遊走活性又は形態形成活性等において糖鎖を有するHGFと同等の活性を有し、温度安定性においても同等である。一方、本発明の糖鎖欠損型HGFは糖鎖を有するHGFよりも血中安定性が向上している。
- [0030] 本発明に係わる糖鎖欠損型HGFは、ヒトを含む哺乳動物(例えば、イヌ、ネコ、ラット、マウス、ウサギ、ウマ、ウシ、ヒツジ、モルモット等)に適用できる。
本発明の糖鎖欠損型HGFを有効成分とする医薬は、野生型の糖鎖が付加されたHGFと同様の用途、例えば肝硬変治療剤、腎疾患治療剤、上皮細胞増殖促進剤、抗ガン剤、ガン療法用副作用防止剤、肺障害治療剤、胃・十二指腸損傷治療剤、脳神経障害治療剤、免疫抑制副作用防止剤、コラーゲン分解促進剤、軟骨障害治療剤、動脈疾患治療剤、肺線維症治療剤、肝臓疾患治療剤、血液凝固異常治療剤、血漿低蛋白治療剤、創傷治療剤、神経障害改善薬、造血幹細胞増加剤又は育毛促進剤等として用いることができる。また、本発明の糖鎖欠損型HGFをコードするDNAを含む医薬は、上記疾患のための遺伝子治療薬として用いることができる。
- [0031] 本発明の糖鎖欠損型HGFは蛋白質医薬品として有効であり、一般的な医薬製剤の形態で用いられる。本発明の糖鎖欠損型HGFを有効成分として含有する医薬製剤は、種々の製剤形態(例えば、液剤、固形剤、カプセル剤等)をとりうるが、一般的には有効成分である糖鎖欠損型HGFと結合性物質のみ、又はそれと慣用の担体と共に注射剤、吸入剤、坐剤又は経口剤とされ、中でも注射剤が好適である。当該注射剤は常法により調製することができ、例えば、糖鎖欠損型HGF及び結合性物質を適切な溶剤(例えば、滅菌された水、緩衝液、生理食塩水等)に溶解した後、該溶解物をフィルター等で濾過して滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。注射剤中の糖鎖欠損型HGF含量としては、通常約0.0002～3(W/V%)程度、好ましくは約0.001～2(W/V%)程度に調製される。また、経口

薬としては、例えば、錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、軟又は硬カプセル剤、液剤、乳剤、懸濁剤又は、シロップ剤等の剤形に製剤化され、これらの製剤は製剤化の常法に準じて調製することができる。坐剤も慣用の基剤(例えば、カカオ脂、ラウリン脂、グリセロゼラチン、マクロゴール、ウイテップゾル等)を用いた製剤上の常法によって調製することができる。また、吸入剤も製剤上の常套手段に準じて調製することができる。製剤中の糖鎖欠損型HGF含量は、剤形、適用疾患等に応じて適宜調製することができる。

[0032] 本発明の糖鎖欠損型HGFの医薬製剤の製剤化に際して、安定化剤が添加されることが好ましい。安定化剤としては、例えば、アルブミン、グロブリン、ゼラチン、アラニン、グリシン、マンニトール、グルコース、デキストラン、ソルビトール、エチレングリコール等が挙げられる。さらに、本発明の医薬製剤は製剤化に必要な他の添加物、例えば、溶剤(例えば、生理食塩液、滅菌精製水、注射用水等)、賦形剤(例えば、果糖、D-ソルビトール、ブドウ糖、デンプン、結晶セルロース、デキストリン等)、結合剤(例えば、ゼラチン、コーンスターク、トラガント、アラビアゴム等)、溶解補助剤(例えば、ラウロマクロゴール、ポリソルベート80、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、アラビアゴム、安息香酸ナトリウム等)、酸化防止剤(例えば、L-アスコルビン酸、トコフェロール、エデト酸ナトリウム等)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン等)、等張化剤(例えば、塩化ナトリウム、ブドウ糖、D-マンニトール、グルセリン等)、緩衝剤(例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸、酢酸ナトリウム、乳酸、リン酸水素ナトリウム等)、増粘剤(アラビアゴム、カルメロース、ポピドン、メチルセルロース等)、保存剤(例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、クロロブタノール、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム等)又はpH調整剤(塩酸、水酸化ナトリウム、クエン酸、酢酸等)などを含んでいてもよい。

液状製剤とした場合は凍結保存、又は凍結乾燥等により水分を除去して保存するのが望ましい。凍結乾燥製剤は、用時に注射用蒸留水等を加え、再溶解して使用される。

また、経口剤とする場合には、顆粒又は錠剤等は、腸溶性コーティング剤(例えば

酢酸フタル酸セルロース、メタアクリル酸コポリマー、ヒドロキシプロピルセルロースフタレート、カルボキシメチルエチルセルロース等)などで剤皮を施されるのが好ましく、カプセル剤では、腸溶性カプセル剤とされるのが好ましい。

[0033] 本発明の医薬製剤は、その製剤形態に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、注射剤の形態にして静脈、動脈、皮下又は筋肉内等に投与することができる。その投与量は、患者の疾患、症状、年齢又は体重等により適宜調整されるが、例えば、成人に対し、通常糖鎖欠損型HGFとして約0.01mg～500mg、好ましくは約0.05mg～100mgであり、これを1日1回ないし数回に分けて投与するのが適当である。

[0034] 本発明の糖鎖欠損型HGFをコードする塩基配列を有するDNAは、上記ベクターに組み込まれ、遺伝子治療薬としても用いることができる。

本発明の遺伝子治療薬は、上記の糖鎖欠損型HGF遺伝子と遺伝子運搬体との複合体として作製されることが好ましい。遺伝子運搬体としては、ウイルスベクター又はカチオン性遺伝子運搬体等が好ましい。ウイルスベクターでは、例えば、マウス白血病ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、HIVベクター、ヘルペスシンプレックスベクター又はセンダイウイルスベクター等が挙げられる。カチオン性遺伝子運搬体では、例えば、ポリリジン又はポリジアミノ酪酸等のポリアミノ酸、あるいはリポソームやエチレンイミン等のカチオン性合成高分子等の遺伝子と親和性のある物質が挙げられる。

[0035] 以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

なお、実施例で使用する各略号の意味は、次のとおりである。

HGF:肝細胞増殖因子

dHGF:5アミノ酸欠失型肝細胞増殖因子

LB培地:Luria-Bertani培地

DMEM培地:ダルベッコ改変イーグル培地

Amp:アンピシリン

FCS:牛胎児血清

NaCl: 塩化ナトリウム

BSA: ウシ血清アルブミン

PBS: リン酸緩衝食塩水

Tween80: ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート

実施例 1

[0036] 配列表の配列番号3に示される5アミノ酸欠失型HGF(dHGF; 野生型dHGFということもある。)をコードする塩基配列をpCAGGSベクターに組み込んだ。得られたベクター(以下、野生型ベクターという。)をpCAGGS-dHGFと称する。

dHGF蛋白質に存在する5箇所の糖鎖付加部位(配列表の配列番号2の289位、397位、471位、561位、648位)に変異を導入するため、表1の5種類の変異プライマー(5'−リン酸化)を合成し、pCAGGS-dHGFベクターをテンプレートとして変異導入を実施した。この変異により、配列番号2で示されるアミノ酸配列のうち、Asn289、Asn397、Asn561、Asn648はGlnに、Thr471はGlyに置換される。

[表1]

プライマー	配列表
5' -tgc gct gac aat act atg caa gac act gat gtt cct ttg-3'	配列番号4
5' -ggc aaa aat tat atg ggc cag tta tcc caa aca aga tct gg-3'	配列番号5
5' -tgc aaa cag gtt ctc caa gtt tcc cag ctg gta tat gg-3'	配列番号6
5' -ggg aag gtg act ctg caa gag tct gaa ata tgt gct gg-3'	配列番号7
5' -ggc gat acc aca cct gga ata gtc aat tta gac cat cc-3'	配列番号8

[0037] 変異導入にはSTRATAGENE社のQuikChange Multi Kitを利用した。変異の導入されたベクター(以下、変異ベクターという。)はE. coli XL10 Goldのコンピテント細胞に形質転換し、LB/Ampプレート上でAmp耐性コロニーをピックアップした。得られた各クローンからプラスミドを抽出し、糖鎖欠損型HGFのコード部分について塩基配列を解析することによって、目的のクローンをスクリーニングした。5箇所に目的の変異が導入され、また他の変異がないことが確認できたベクターを選択し、以後の実験に用いた。得られた変異ベクターはpCAGGS-dHGF-NGと称する。また、上記1、2、3の3種の変異プライマーを用いて同様の操作を行い、 α 鎖の3箇所

の糖鎖を欠損するように設計した変異ベクターpCAGGS-dHGF- α NGを作製した。さらに、上記3、4の変異プライマーを用いて同様の操作を行い、 β 鎖の2箇所の糖鎖を欠損するように設計した変異ベクターpCAGGS-dHGF- β NGを作製した。

[0038] 次に、野生型ベクターpCAGGS-dHGF及び変異ベクターpCAGGS-dHGF-N G、pCAGGS-dHGF- α NG、pCAGGS-dHGF- β NGをそれぞれCOS-7細胞にトランスフェクトした。COS-7細胞はDMEM培地に牛胎児血清(FCS)を10%添加して培養した。細胞はトランスフェクションの直前に無血清DMEM培地に交換した。トランスフェクションはリポフェクタミン2000(Invitrogen)を用いてリポフェクション法によって行った。トランスフェクションの6時間後、1%FCSを含むDMEMに培地交換し、その際にヘパリンを1 μ g/mLとなるように添加した。これを3日間培養し、野生型dHGF及び糖鎖欠損型dHGFを培地中に蓄積させた。3日後に培地を回収して混合し、0.22 μ mフィルターで濾過した後、精製に供するまで-80°Cで保存した。培地中に分泌された野生型dHGF及び糖鎖欠損型dHGFの濃度はELISAによって分析した。

[0039] 上記の培地を解凍し、再度0.22 μ mフィルターで濾過した後、50mM Tris-HCl(pH7.5)、0.01%Tween80、0.3M NaClで平衡化したHiTrap Heparin(Bed volume:5mL)(Amersham Biosciences)に0.6mL/分の流速で添加した。カラムを50mM Tris-HCl(pH7.5)、0.01%Tween80、0.3M NaClで洗浄後、NaCl濃度を2Mまで上昇させることによって野生型dHGF及び糖鎖欠損型dHGFを溶出させた。溶出は1mL/分の流速で行い、2.5mL/tubeで分画した。野生型dHGF及び糖鎖欠損型dHGFの存在する画分を回収し、限外濾過によって50mM Tris-HCl(pH7.5)、0.01%Tween80、0.3M NaClにbuffer交換した。これを同bufferで平衡化したMini Sカラム(Bed volume:0.8mL)(Amersham Biosciences)に0.4mL/分の流速で添加した。カラムを50mM Tris-HCl(pH7.5)、0.01%Tween80、0.3M NaClで洗浄後、NaCl濃度を1Mまで上昇させることによって野生型dHGF及び糖鎖欠損型dHGFを溶出させた。溶出は0.4mL/分の流速で行い、0.4mL/tubeで分画した。野生型dHGF及び糖鎖欠損型dHGFの存在する画分を回収し、精製状態をSDS-PAGEによって確認した。

[0040] 野生型ベクターの導入によって得られたdHGFをCOS-dHGF-WT、変異ベクターの導入によって得られた糖鎖欠損型dHGFをそれぞれCOS-dHGF-NG、COS-dHGF- α NG又はCOS-dHGF- β NGと称する。

また、特開平10-191991に記載の方法に従ってCHO細胞によってもdHGF蛋白質を調製した(CHO-dHGF-WTと称する)。

[0041] これらのdHGF及び糖鎖欠損型dHGFをSDS-PAGEによって比較した結果を図1に示す。糖鎖欠損型dHGFのCOS-dHGF-NGでは、 α 鎖及び β 鎖ともに糖鎖を欠損する分子量に対応する位置にバンドがシフトしていることが確認された。糖鎖付加型(野生型)dHGFであるCOS-dHGF-WTとCHO-dHGF-WTを比較すると、COS-dHGF-WTはCHO-dHGF-WTより糖鎖付加の程度が少ないが、これは宿主として用いたCOS細胞とCHO細胞の糖鎖付加能力の差あるいは精製方法の差によるものと考えられた。 α 鎖の糖鎖のみを欠損するCOS-dHGF- α NGでは、 α 鎖のバンドが糖鎖を欠損する分子量に対応する位置にシフトしていることが確認された。 β 鎖の糖鎖のみを欠損するCOS-dHGF- β NGでは、 β 鎖のバンドが糖鎖を欠損する分子量に対応する位置にシフトしていることが確認された。

実施例 2

[0042] 実施例1で得られた野生型dHGF及び糖鎖欠損型dHGFを用いて、ラット肝実質細胞に対する増殖活性を測定した。

SDラット(8週齢、雄)から、コラゲナーゼ灌流法によって肝実質細胞を分離した。得られた肝実質細胞を5%FCSを含むウイリアムズE(WE)培地に懸濁し、3万個/ cm^2 の細胞密度で培養ディッシュに播いた。4時間後に培地を除去して新しいWE培地(5%FCSを含む)480 μL に置換し、培養を継続した。さらに20時間後に野生型dHGF及び糖鎖欠損型dHGFを含むサンプル溶液を20 μL 添加し、培養を継続した。野生型dHGF及び糖鎖欠損型dHGFを添加してから20時間の後、[^3H]チミジン(25Ci/mmol)を2.5 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ となるように添加し、さらに培養を6時間継続した。その後、細胞をPBSで2回洗浄し、10%トリクロロ酢酸を添加して4°Cで20分間静置した。さらに、新しい10%トリクロロ酢酸に置換して10分間静置し、次にH₂O1mLで洗浄した。これに0.5N-NaOHを加えて37°Cで30分間インキュベートし、細胞を

溶解させた。細胞溶解液に1N-HClを加えて中和した。これをセルハーベスターにかけ、細胞溶解物をガラスフィルターに捕集した。フィルターを乾燥させた後、フィルター上に固体シンチレーター(MeltiLex)をのせてホットプレート上で加温し、シンチレーターをフィルター中に溶け込ませた後、 β -カウンターによって放射活性を測定した(図2)。放射活性の値は、細胞に取り込まれた [3 H]チミジンの量を表しており、これは細胞増殖に伴うDNA合成の量を反映している。すなわち、放射活性の値は、細胞増殖活性を反映している。

糖鎖欠損型dHGF(COS-dHGF-NG)は、野生型dHGF(COS-dHGF-WT)及びCHO-dHGF-WT)と同等の肝細胞増殖活性を示した。 α 鎖の糖鎖を欠損するCOS-dHGF- α NG及び β 鎖の糖鎖を欠損するCOS-dHGF- β NGも同等の活性を示した。

実施例 3

[0043] MDCK-3B細胞をDMEM(10%FCSを含む)に懸濁して24wellプレートに 1×10^4 cells/well($480 \mu L$ /well)で播き、ここに野生型dHGF及び糖鎖欠損型dHGFを含む被検サンプル $20 \mu L$ を添加した。37°Cで20時間培養した後、scatterの有無を顕微鏡で観察した(図3)。

糖鎖欠損型dHGF(COS-dHGF-NG)は、野生型dHGF(COS-dHGF-WT)及びCHO-dHGF-WT)と同等の細胞遊走活性を示した。 α 鎖の糖鎖を欠損するCOS-dHGF- α NG及び β 鎖の糖鎖を欠損するCOS-dHGF- β NGも同等の活性を示した。

実施例 4

[0044] DMEM(10%FCSを含む)に溶解したコラーゲン溶液(Cellmatrix I-A、新田ゼラチン)にMDCK-3B細胞を懸濁して5000cells/mLの溶液とし、24wellプレートに $500 \mu L$ ずつ分注した(2500cells/well)。37°Cで10分間インキュベートしてコラーゲンをゲル化した後、DMEM(10%FCSを含む)を $480 \mu L$ 上層し、ここに野生型dHGF及び糖鎖欠損型dHGFを含む被検サンプル $20 \mu L$ を添加した。37°Cで6日間培養した後、チューブ形成の状態を顕微鏡で観察した(図4)。

糖鎖欠損型dHGF(COS-dHGF-NG)は、野生型dHGF(COS-dHGF-WT)

及びCHO-dHGF-WT)と同等の形態形成活性を示した。 α 鎖の糖鎖を欠損するCOS-dHGF- α NG及び β 鎖の糖鎖を欠損するCOS-dHGF- β NGも同等の活性を示した。

実施例 5

[0045] 野生型dHGF及び糖鎖欠損型dHGFサンプルを50mM Tris-HCl(pH7.5)、0.01%Tween80、0.3M NaClで希釈して50 μ g/mLの濃度に調製し、密封した容器に入れて37°Cで7日間インキュベートした。経目的に一部をサンプリングして、-80°Cに保存した。サンプリングした溶液中の野生型dHGF及び糖鎖欠損型dHGFの残存活性を、実施例2と同様にしてラット肝実質細胞におけるDNA合成を調べることによって評価した。活性測定にあたっては、サンプリングした溶液をPBS、0.5% BSAで125ng/mLに希釈した後、その20 μ Lを肝細胞の培養液480 μ Lに添加してfinal 5ng/mLとした。

糖鎖欠損型dHGF(COS-dHGF-NG)は、野生型dHGF(COS-dHGF-WT)及びCHO-dHGF-WT)と同等の温度安定性を示した(図5)。 α 鎖の糖鎖を欠損するCOS-dHGF- α NG及び β 鎖の糖鎖を欠損するCOS-dHGF- β NGも同等の安定性を示した。

実施例 6

[0046] 80 μ Lの50mM Tris-HCl(pH7.5)、0.01%Tween80、0.3M Na¹²⁵Iを50 μ Ci添加し、これにIODO-BEADS (PIERCE)を1粒添加して、室温で5分間インキュベートした。ここに5 μ gの野生型dHGF及び糖鎖欠損型dHGFを含む20 μ Lの溶液(50mM Tris-HCl(pH7.5)、0.01%Tween80、0.3M NaCl)を添加し、室温で5分間インキュベートすることによってヨード化反応を行った。チューブから反応液を抜き出すことによってヨード化反応を停止させ、抜き出した反応液をSephadex G-25 (Amersham Biosciences)カラムによるゲルfiltrationに供することによって未反応のNa¹²⁵Iを除去し、¹²⁵I-dHGFを精製した。

500,000cpmの¹²⁵I-dHGFを、0.1%BSAを含むPBSで希釈して100 μ Lの溶液とした。これをICRマウス(8週齢、雄)に尾静脈から投与した。投与後、1分、5分、15分、30分、60分、120分に血液を採取した。採取した血液から血漿を分離し、ガ

ンマカウンターにて放射活性を測定し野生型dHGF及び糖鎖欠損型dHGFの血中安定性を評価した(図6)。

糖鎖欠損型dHGF(COS-dHGF-NG)は、CHO-dHGF-WTに比べて、血中の安定性が向上していた。COS-dHGF-WTはCOS-dHGF-NGとCHO-dHGF-WTの中間の安定性を示した。これは、実施例1に示したように、COS-dHGF-WTが糖鎖を部分的に欠損しているためと考えられた。

産業上の利用可能性

[0047] 本発明の糖鎖欠損型HGFは、糖鎖が付加したHGFの代替HGFとして有用である

。

請求の範囲

- [1] 肝細胞増殖因子の糖鎖付加部位の全部又は少なくとも一ヶ所において糖鎖が欠損していることを特徴とする糖鎖欠損型肝細胞増殖因子。
- [2] 請求の範囲第1項記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子であって、肝細胞増殖因子の少なくとも1ヶ所の糖鎖付加部位において糖鎖が付加されないようにアミノ酸配列に変異が導入された糖鎖欠損型肝細胞増殖因子。
- [3] 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列に対して、次のa)からd)に示される改変の少なくとも一つ以上がなされていることを特徴とする請求の範囲第2項記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子；
- a) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列中に存在するAsn-X-Ser又はAsn-X-Thr(XはPro以外のアミノ酸を示す。)で示されるN-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列のうち、少なくとも一つのコンセンサス配列のAsnが他のアミノ酸残基に置換されている；
 - b) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列中に存在するAsn-X-Ser又はAsn-X-Thr(XはPro以外のアミノ酸を示す。)で示されるN-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列のうち、一つのコンセンサス配列のSer又はThr、あるいは2以上のコンセンサス配列のSer又は／及びThrが他のアミノ酸残基に置換されている；
 - c) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列中に存在するAsn-X-Ser又はAsn-X-Thr(XはPro以外のアミノ酸を示す。)で示されるN-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列のうち、少なくとも一つのコンセンサス配列のXがProに置換されている；又は
 - d) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列中に存在する少なくとも一つのO-結合型糖鎖付加を受けるSer又は／及びThrが他のアミノ酸残基に置換されている。
- [4] 肝細胞増殖因子がヒト肝細胞増殖因子であることを特徴とする請求の範囲第1項から第3項のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子。
- [5] 肝細胞増殖因子がネコ又はイヌ肝細胞増殖因子であることを特徴とする請求の範囲第1項から第3項のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子。
- [6] 配列番号1に記載のアミノ酸配列をもとに改変される請求の範囲第1項から第4項のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子であって、配列番号1中のアミノ酸

に対して、次のa)からe)に示される改変の少なくとも一つ以上がなされていることを特徴とする糖鎖欠損型肝細胞増殖因子；

- a) 第294位又は／及び第296位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第295位のアミノ酸がProに置換されていることによって第294位に糖鎖が付加されていない；
- b) 第402位又は／及び第404位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第403位のアミノ酸がProに置換されていることによって第402位に糖鎖が付加されていない；
- c) 第476位のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることによって第476位に糖鎖が付加されていない；
- d) 第566位又は／及び第568位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第567位のアミノ酸がProに置換されていることによって第566位に糖鎖が付加されていない；
又は
- e) 第653位又は／及び第655位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第654位のアミノ酸がProに置換されていることによって第653位に糖鎖が付加されていない。

[7] 配列番号2に記載のアミノ酸配列をもとに改変される請求の範囲第1項から第4項のいずれかに記載の肝細胞増殖因子であって、配列番号2中のアミノ酸に対して、次のa)からe)に示される改変の少なくとも一つ以上がなされていることを特徴とする糖鎖欠損型肝細胞増殖因子；

- a) 第289位又は／及び第291位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第290位のアミノ酸がProに置換されていることによって第289位に糖鎖が付加されていない；
- b) 第397位又は／及び第399位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第398位のアミノ酸がProに置換されていることによって第397位に糖鎖が付加されていない；
- c) 第471位のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることによって第471位に糖鎖が付加されていない；
- d) 第561位又は／及び第563位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第562位のアミノ酸がProに置換されていることによって第561位に糖鎖が付加されていない；
又は
- e) 第648位又は／及び第650位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第649位のアミノ酸がProに置換されていることによって第648位に糖鎖が付加されていない。

- [8] 請求の範囲第1項から第7項のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子をコードしうる塩基配列からなるDNA。
- [9] 請求の範囲第8項記載のDNAを組み込んだベクター。
- [10] 請求の範囲第9項記載のベクターを細胞に導入し、該細胞を培養し、該細胞内もしくは該細胞の培養液中に糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を產生せしめ、該細胞内もしくは該細胞の培養液中から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする請求の範囲第1項から第7項のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。
- [11] 細胞が真核細胞である請求の範囲第10項記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。
- [12] 真核細胞が酵母又は昆虫細胞である請求の範囲第11項記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。
- [13] 請求の範囲第9項記載のベクターを昆虫個体に導入し、昆虫個体中に糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を產生せしめ、該昆虫個体から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする請求の範囲第1項から第7項のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。
- [14] 糖鎖を有する肝細胞増殖因子を酵素で処理することによって糖鎖を全部又は部分的に除去し、該酵素反応液から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする請求の範囲第1項から第7項のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。
- [15] 糖鎖を有する肝細胞増殖因子をコードする塩基配列を含むDNAを組み込んだベクター又は請求の範囲第9項記載のベクターからなる遺伝子を糖鎖付加能のない細胞に導入し、該細胞を培養し、該細胞内もしくは該細胞の培養液中に糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を產生せしめ、該細胞内もしくは該細胞の培養液中から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする請求の範囲第1項から第7項のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。
- [16] 糖鎖を有する肝細胞増殖因子をコードする塩基配列又は請求の範囲第8項記載の塩基配列からなる遺伝子を鋳型として無細胞蛋白質合成システムによって糖鎖欠損

型肝細胞増殖因子を合成し、該合成反応液から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする請求の範囲第1項から第7項のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。

- [17] 請求の範囲第1項から第7項のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を有効成分とする医薬製剤。
- [18] 請求の範囲第8項記載のDNAを含む遺伝子治療薬。

補正書の請求の範囲

[2005年4月8日 (08. 04. 05) 国際事務局受理：出願当初の請求の範囲
1, 2, 6, 7及び14は補正された；他の請求の範囲は
変更なし。 (4頁)]

- [1] (補正後) 肝細胞増殖因子の糖鎖付加部位の全部において糖鎖が欠損していることを特徴とする糖鎖欠損型肝細胞増殖因子。
- [2] (補正後) 糖鎖欠損型肝細胞増殖因子であって、肝細胞増殖因子の少なくとも1ヶ所の糖鎖付加部位において糖鎖が付加されないようにアミノ酸配列に変異が導入された糖鎖欠損型肝細胞増殖因子。
- [3] 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列に対して、次のa)からd)に示される改変の少なくとも一つ以上がなされていることを特徴とする請求の範囲第2項記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子；
- a) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列中に存在するAsn-X-Ser又はAsn-X-Thr (XはPro以外のアミノ酸を示す。)で示されるN-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列のうち、少なくとも一つのコンセンサス配列のAsnが他のアミノ酸残基に置換されている；
 - b) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列中に存在するAsn-X-Ser又はAsn-X-Thr (XはPro以外のアミノ酸を示す。)で示されるN-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列のうち、一つのコンセンサス配列のSer又はThr、あるいは2以上のコンセンサス配列のSer又は/及びThrが他のアミノ酸残基に置換されている；
 - c) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列中に存在するAsn-X-Ser又はAsn-X-Thr (XはPro以外のアミノ酸を示す。)で示されるN-結合型糖鎖付加のコンセンサス配列のうち、少なくとも一つのコンセンサス配列のXがProに置換されている；又は
 - d) 肝細胞増殖因子のアミノ酸配列中に存在する少なくとも一つのO-結合型糖鎖付加を受けるSer又は/及びThrが他のアミノ酸残基に置換されている。
- [4] 肝細胞増殖因子がヒト肝細胞増殖因子であることを特徴とする請求の範囲第1項から第3項のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子。
- [5] 肝細胞増殖因子がネコ又はイヌ肝細胞増殖因子であることを特徴とする請求の範囲第1項から第3項のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子。
- [6] (補正後) 配列番号1に記載のアミノ酸配列をもとに改変される請求の範囲第2項から第4項のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子であって、配列番号1中のアミノ酸が補正された用紙 (条約第19条)

ノ酸に対して、次の a) から e) に示される改変の少なくとも一つ以上がなされていることを特徴とする糖鎖欠損型肝細胞増殖因子；

- a) 第 294 位又は／及び第 296 位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第 295 位のアミノ酸が Pro に置換されていることによって第 294 位に糖鎖が付加されていない；
- b) 第 402 位又は／及び第 404 位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第 403 位のアミノ酸が Pro に置換されていることによって第 402 位に糖鎖が付加されていない；
- c) 第 476 位のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることによって第 476 位に糖鎖が付加されていない；
- d) 第 566 位又は／及び第 568 位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第 567 位のアミノ酸が Pro に置換されていることによって第 566 位に糖鎖が付加されていない；又は
- e) 第 653 位又は／及び第 655 位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第 654 位のアミノ酸が Pro に置換されていることによって第 653 位に糖鎖が付加されていない。

- [7] (補正後) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列をもとに改変される請求の範囲第 2 項から第 4 項のいずれかに記載の肝細胞増殖因子であって、配列番号 2 中のアミノ酸に対して、次の a) から e) に示される改変の少なくとも一つ以上がなされていることを特徴とする糖鎖欠損型肝細胞増殖因子；
- a) 第 289 位又は／及び第 291 位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第 290 位のアミノ酸が Pro に置換されていることによって第 289 位に糖鎖が付加されていない；
 - b) 第 397 位又は／及び第 399 位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第 398 位のアミノ酸が Pro に置換されていることによって第 397 位に糖鎖が付加されていない；
 - c) 第 471 位のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることによって第 471 位に糖鎖が付加されていない；
 - d) 第 561 位又は／及び第 563 位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第 562 位のアミノ酸が Pro に置換されていることによって第 561 位に糖鎖が付加されていない；又は
 - e) 第 648 位又は／及び第 650 位のアミノ酸が他のアミノ酸に、又は／及び第 649 位のアミノ酸が Pro に置換されていることによって第 648 位に糖鎖が付加されていない。

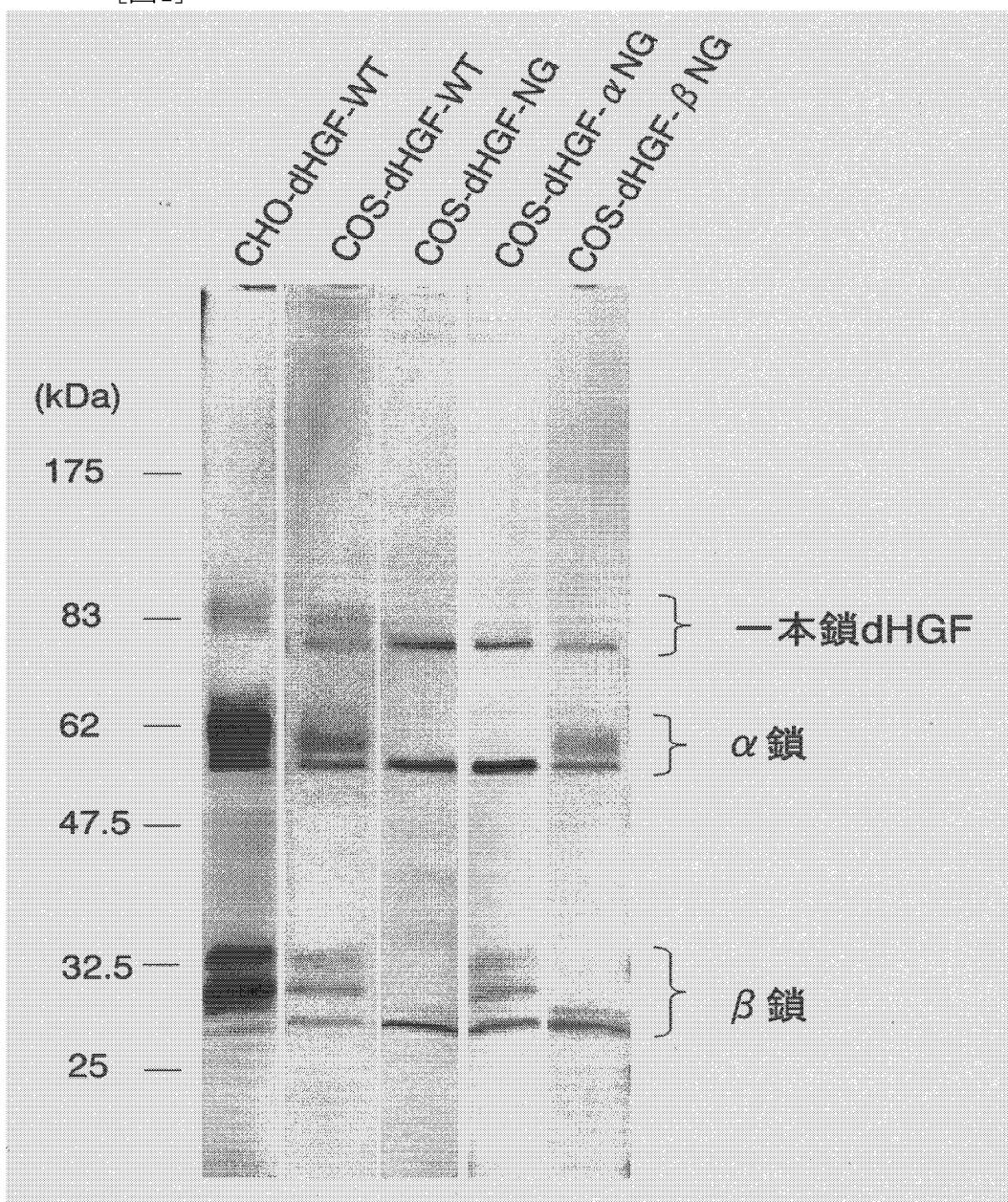
- [8] 請求の範囲第1項から第7項のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子をコードしうる塩基配列からなるDNA。
- [9] 請求の範囲第8項記載のDNAを組み込んだベクター。
- [10] 請求の範囲第9項記載のベクターを細胞に導入し、該細胞を培養し、該細胞内もしくは該細胞の培養液中に糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を產生せしめ、該細胞内もしくは該細胞の培養液中から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする請求の範囲第1項から第7項のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。
- [11] 細胞が真核細胞である請求の範囲第10項記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。
- [12] 真核細胞が酵母又は昆虫細胞である請求の範囲第11項記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。
- [13] 請求の範囲第9項記載のベクターを昆虫個体に導入し、昆虫個体中に糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を產生せしめ、該昆虫個体から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする請求の範囲第1項から第7項のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。
- [14] (補正後) 糖鎖を有する肝細胞増殖因子を酵素で処理することによって糖鎖を全部除去し、該酵素反応液から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする請求の範囲第1項に記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。
- [15] 糖鎖を有する肝細胞増殖因子をコードする塩基配列を含むDNAを組み込んだベクター又は請求の範囲第9項記載のベクターからなる遺伝子を糖鎖付加能のない細胞に導入し、該細胞を培養し、該細胞内もしくは該細胞の培養液中に糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を產生せしめ、該細胞内もしくは該細胞の培養液中から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする請求の範囲第1項から第7項のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。
- [16] 糖鎖を有する肝細胞増殖因子をコードする塩基配列又は請求の範囲第8項記載の塩基配列からなる遺伝子を鋳型として無細胞蛋白質合成システムによって糖鎖欠損

型肝細胞増殖因子を合成し、該合成反応液から糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を精製回収することを特徴とする請求の範囲第1項から第7項のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子の製造法。

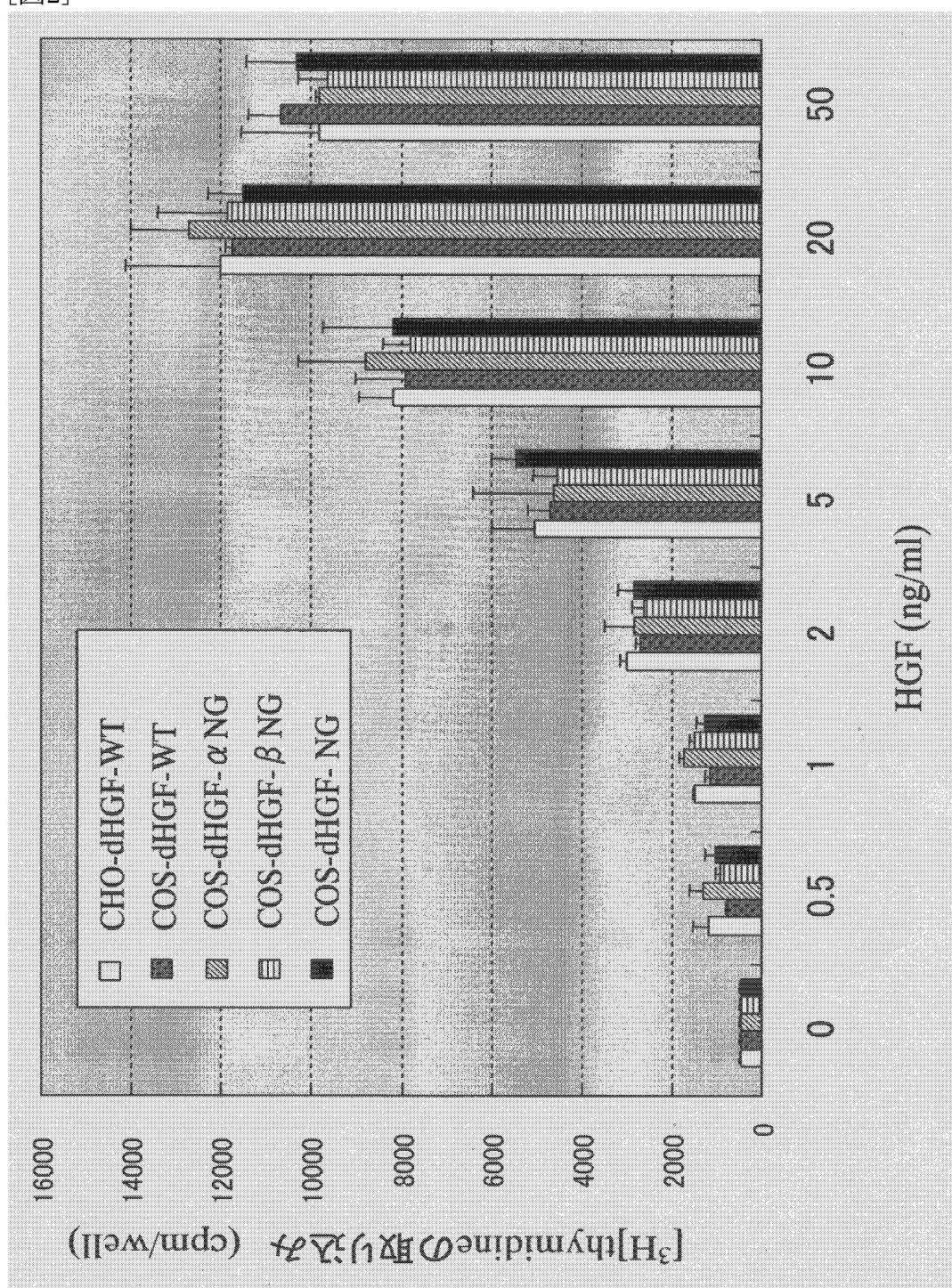
[17] 請求の範囲第1項から第7項のいずれかに記載の糖鎖欠損型肝細胞増殖因子を有効成分とする医薬製剤。

[18] 請求の範囲第8項記載のDNAを含む遺伝子治療薬。

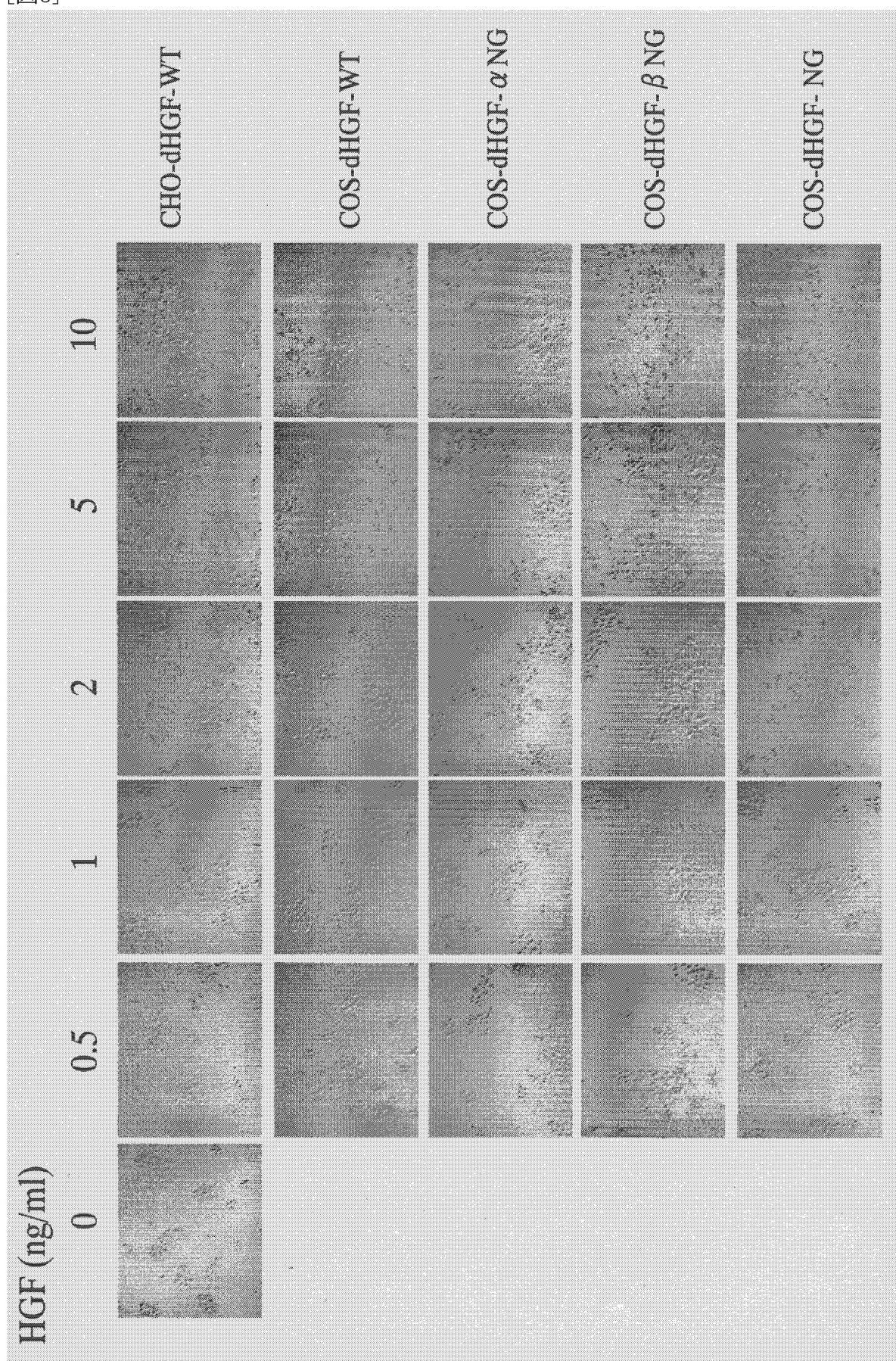
[図1]



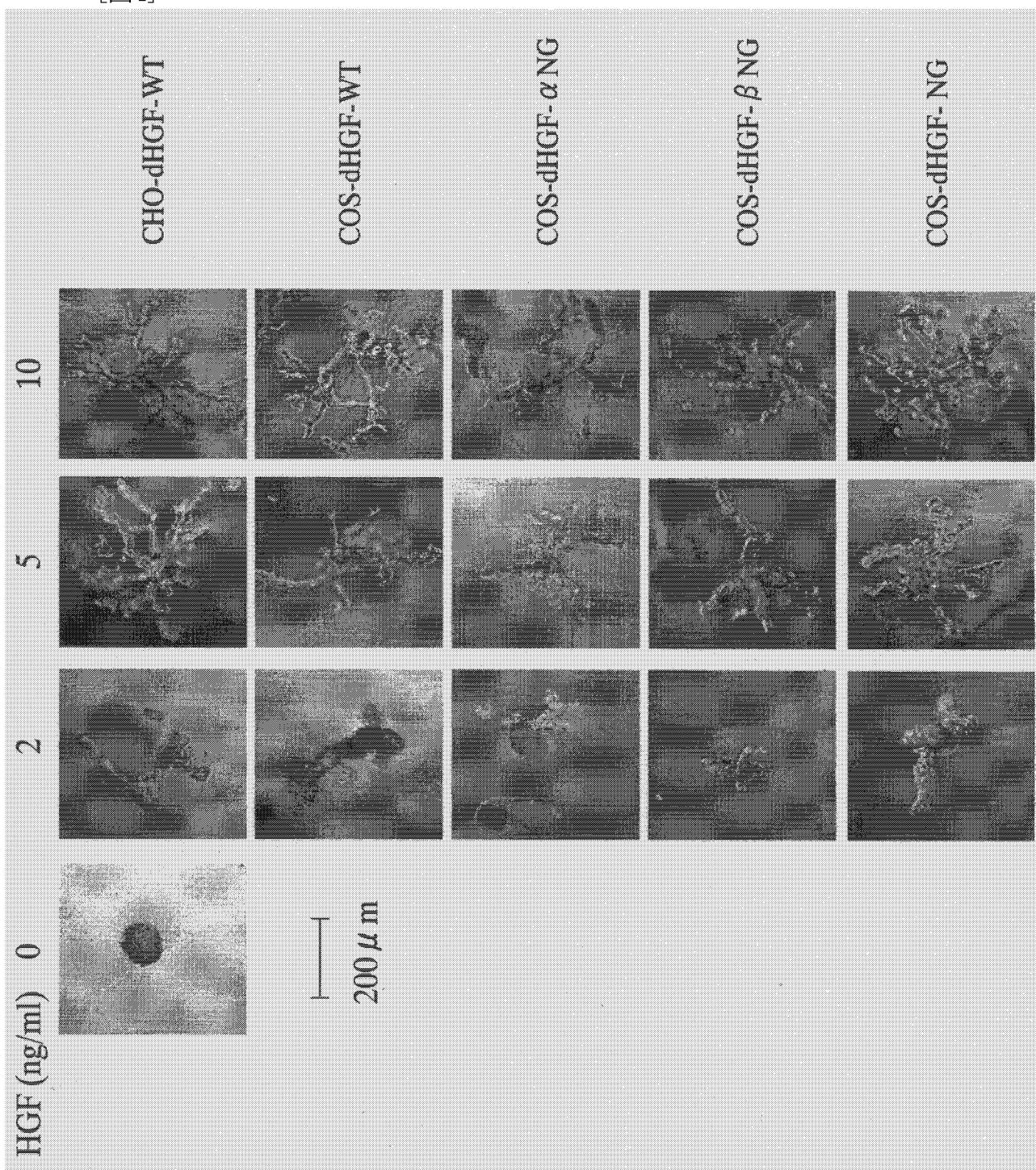
[図2]



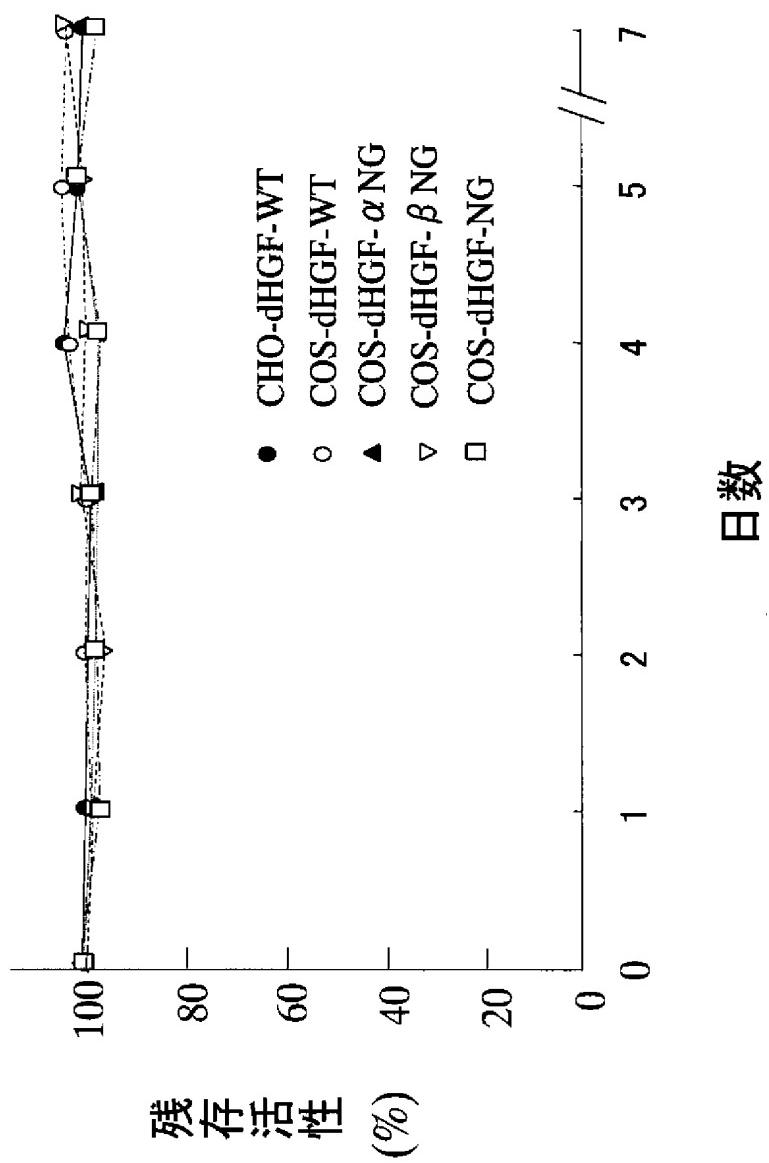
[図3]



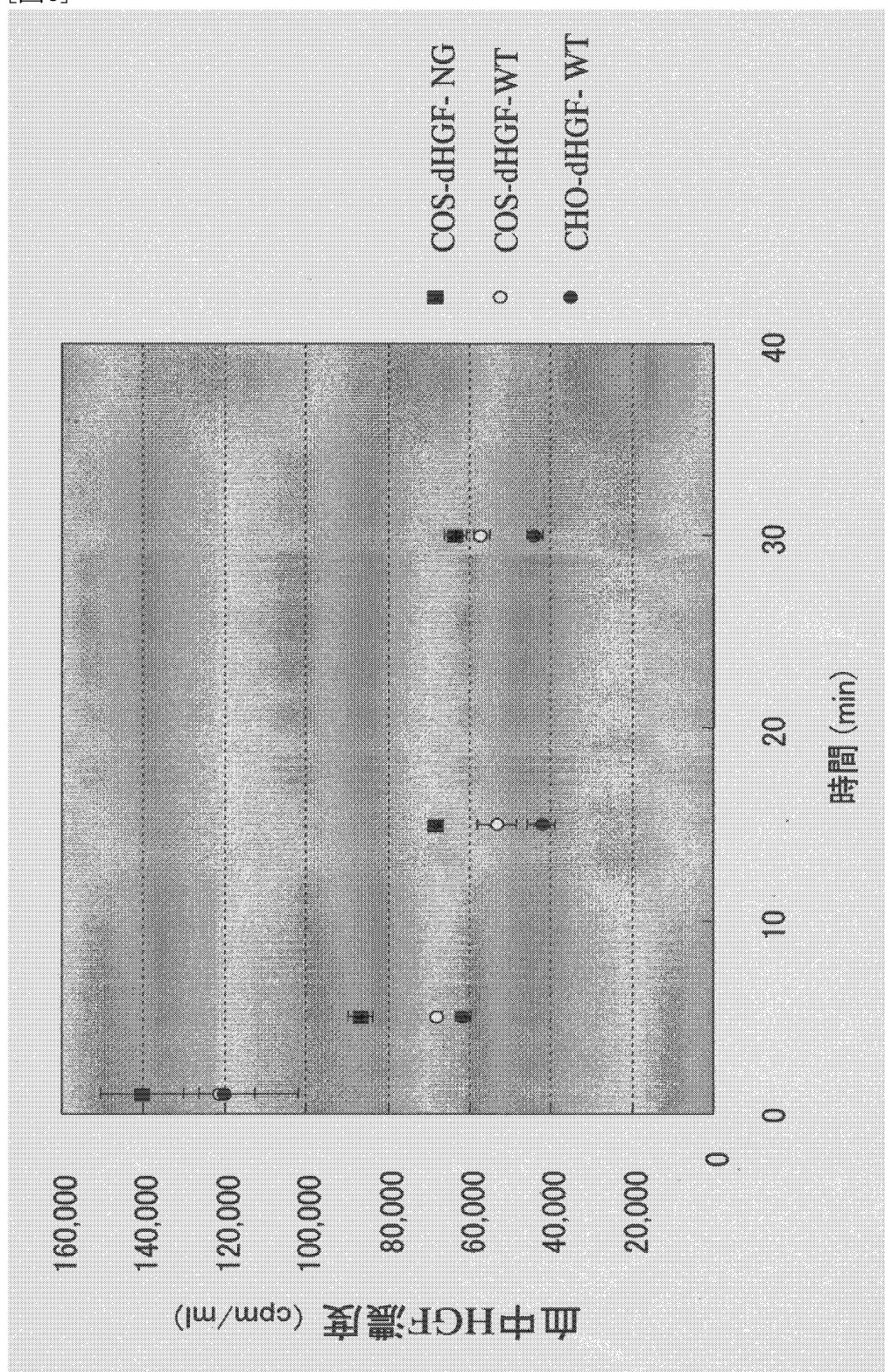
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018719

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/52, C12N15/19, C12P21/02, A61K31/711, 48/00, A61P1/04, 1/16, 7/00, 9/00, 11/00, 13/12, 17/02, 17/14, 19/04, 19/08, 25/28, 35/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K14/52, C12N15/19, C12P21/02, A61K31/711, 48/00, A61P1/04, 1/16, 7/00, 9/00, 11/00, 13/12, 17/02, 17/14, 19/04, 19/08, 25/28, 35/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubMed, BIOSIS/WPI (DIALOG), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PIR/SwissProt/
GeneSeq, JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Hofmann R. et al., Scatter factor is a glycoprotein but glycosylation is not required for its activity., Biochim.Biophys.Acta., 1992, 1120(3), p.343-50	1, 4, 14/ 2-3, 5-13, 15-18
X/Y	MIYAZAWA, K. et al., Human hepatocyte growth factor (hHGF), mRNA, complete cds., Database GenBank accesino No.M29145, 08 November, 1994 (08.11.94)	8/1-7, 9-18
X/Y	Weidner K.M. et al., Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1991, 88(16) : 7001-5	8/1-7, 9-18

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 January, 2005 (13.01.05)

Date of mailing of the international search report
01 February, 2005 (01.02.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2004/018719
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 7-508420 A (Genentech, Inc.), 21 September, 1995 (21.09.95), Particularly, page 8, lower left column, line 28 to page 9, lower left column, line 3 & WO 93/23541 A1 & EP 642580 A1 & US 5316921 A & US 5328837 A & US 5580963 A & US 5879910 A	1-18
A	HARA H. et al., Structural study of the N-linked oligosaccharies of hepatocyte growth factor by two-dimensional sugar mapping., J.Biochem. (Tokyo), 1993, 114(1), pages 76 to 82	1-18
A	Bellosta P. et al., Cleavage of K-FGF produces a truncated molecule with increased biological activity and receptor binding affinity., J.Cell. Biol., 1993, 121(3), p.705-13	1-18
A	AIKAWA, J. et al., Asparagine-linked glycosylation of the rat leukemia inhibitory factor expressed by simian COS7 cells., Biosci. Biotechnol.Biochem., 1998, 62(7), p.1318-25	1-18
A	Bjoern S. et al., Human plasma and recombinant factor VII., Characterization of O-glycosylations at serine residues 52 and 60 and effects of site-directed mutagenesis of serine 52 to alanine., J.Biol.Chem., 1991, 266(17), p.11051-7	1-18
A	Davis-Fleische K.M. et al., Site-directed mutagenesis of heparin-binding EGF-like growth factor(HB-EGF), analysis of O-glycosylation sites and properties., Growth Factors, 2001, 19(2), p.127-43	1-18
P,X	FUKUDA K. et al., Functional Analysis of Suger Chains on HGF Based no Deglycosylation., Seikagaku, 2004, August, 76(8), p.1035, 4P-214	1-18
P,A	ADACHI E. et al., Functional Analysis of Sugar Chains on NK4 (HGF antagonist/angiogenesis inhibitor). Seikagaku, 2004, August, 76(8), page 1103, 4P-622	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018719

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018719

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

<Unity of invention>

It is recognized that the matter common to claims 1 to 18 resides in a sugar chain-lacking hepatocyte growth factor characterized by lacking sugar chain(s) in all sugar chain-attachment sites or at least one of them in the amino acid sequence of hepatocyte growth factor and matters relating thereto.

However, a sugar chain-lacking hepatocyte growth factor lacking a sugar chain in at least one sugar chain-attachment site in the amino acid sequence of hepatocyte growth factor is reported in *Biochim. Biophys. Acta.*, 1992, 1120(3), p.343-50. Thus, it has been found out that the above common matter is not novel because of having been reported in this document.

That is to say, the above common matter falls within the category of prior art and, therefore, cannot be considered as a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2.

Thus, there is no matter common to all claims. Since there is no other common matter seemingly being a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2, no technical relationship can be found among these inventions differing from each other in the meaning within PCT Rule 13.

Such being the case, it is obvious that claims 1 to 18 do not comply with the requirement of unity of invention.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C07K14/52, C12N15/19, C12P21/02, A61K31/711, 48/00, A61P1/04, 1/16, 7/00, 9/00, 11/00, 13/12, 17/02, 17/14, 19/04, 19/08, 25/28, 35/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C07K14/52, C12N15/19, C12P21/02, A61K31/711, 48/00, A61P1/04, 1/16, 7/00, 9/00, 11/00, 13/12, 17/02, 17/14, 19/04, 19/08, 25/28, 35/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

PubMed, BIOSIS/WPI(DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PIR/SwissProt/GeneSeq, JSTPlus(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	Hofmann R. et al., Scatter factor is a glycoprotein but glycosylation is not required for its activity. Biochim. Biophys. Acta., 1992, 1120(3), p. 343-50	1, 4, 14 /2-3, 5-13, 15-18
X/Y	Miyazawa K. et al., Human hepatocyte growth factor (hHGF) mRNA, complete cds. Database GenBank accession No. M29145, November 8, 1994	8/1-7, 9-18

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
13.01.2005国際調査報告の発送日
01.2.2005

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)
上條 肇

4B 3131

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X/Y	Weidner K. M. et al., Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. , 1991, 88(16):7001-5	8/1-7, 9-18
Y	JP 7-508420 A(ジェネンテク, インコーポレイテッド) 1995. 09. 21 特に, 第8頁左下欄第28行-第9頁左下欄第3行参照 & WO 93/23541 A1 & EP 642580 A1 & US 5316921 A & US 5328837 A & US 5580963 A & US 5879910 A	1-18
Y	Hara H. et al., Structural study of the N-linked oligosaccharides of hepatocyte growth factor by two-dimensional sugar mapping. J. Biochem. (Tokyo), 1993, 114(1), p. 76-82	1-18
A	Bellosta P. et al., Cleavage of K-FGF produces a truncated molecule with increased biological activity and receptor binding affinity. J. Cell. Biol., 1993, 121(3), p. 705-13	1-18
A	Aikawa J. et al., Asparagine-linked glycosylation of the rat leukemia inhibitory factor expressed by simian COS7 cells. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1998, 62(7), p. 1318-25	1-18
A	Bjoern S. et al., Human plasma and recombinant factor VII. Characterization of O-glycosylations at serine residues 52 and 60 and effects of site-directed mutagenesis of serine 52 to alanine. J. Biol. Chem., 1991, 266(17), p. 11051-7	1-18
A	Davis-Fleische K. M. et al., Site-directed mutagenesis of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF): analysis of O-glycosylation sites and properties. Growth Factors, 2001, 19(2), p. 127-43	1-18
PX	Fukuta K. et al., Functional Analysis of Sugar Chains on HGF Based on Deglycosylation. 生化学, 2004 Aug., 76(8), p. 1035, 4P-214	1-18
PA	Adachi E. et al., Functional Analysis of Sugar Chains on NK4 (HGF antagonist/angiogenesis inhibitor). 生化学, 2004 Aug., 76(8), p. 1103, 4P-622	1-18

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
 2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
 3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
-
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。

<発明の单一性について>

請求の範囲1-18に共通の事項は、肝細胞増殖因子の糖鎖付加部位の全部又は少なくとも一ヶ所において糖鎖が欠損していることを特徴とする糖鎖欠損型肝細胞増殖因子およびそれに関するものであると認められる。

しかしながら、*Biochim. Biophys. Acta.*, 1992, 1120(3), p. 343-50には、肝細胞増殖因子の糖鎖付加部位の少なくとも一ヶ所において糖鎖が欠損している糖鎖欠損型肝細胞増殖因子が記載されているので、上記共通事項は、該文献に記載されており、新規でないことが明らかとなつた。

即ち、上記共通事項は先行技術の域を出ないので、PCT規則13.2の第2文の意味における特別な技術的特徴ではない。

それ故、請求の範囲全てに共通の事項はない。PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

よって、請求の範囲1-18が单一性の要件を満たしていないことは明らかである。